14A

Aus dem Imperial Cancer Research, London (Direktor: Dr. E. F. Bashford).

Die Lebensdauer der Mäusecarcinomzellen bei Bruttemperatur (37° C).

Von

B. R. G. Russell und W. E. Bullock.

Sonderabdruck aus der Berliner klin. Wochenschr., 1914, Nr. 16.

(Verlag von August Hirschwald in Berlin).



Sonderabdruck aus der Berliner klin. Wochenschr., 1914, Nr. 16.

Aus dem Imperial Cancer Research, London (Direktor Dr. E. F. Bashford).

Die Lebensdauer der Mäusecarcinomzellen bei Bruttemperatur (37° C).

Von

B. R. G. Russell und W. E. Bullock.

Untersuchungen über die sogenannte Vita propria der Zellen haben einen neuen Anstoss erfahren, nachdem man an der Hand der leicht transplantablen Tumoren der Nagetiere ein für diesen Zweck so günstiges Objekt zur Verfügung hat. Das einfache Transplantieren der dem Einfluss verschiedener Agentien ausgesetzten Tumorzellen lässt es ziemlich genau bestimmen, inwieweit die gewählte Manipulation die weitere Wucherungsfähigkeit der genannten Zellen geschädigt hat. Von den auf diese Weise ersonnenen Experimenten bilden diejenigen, die die Wirkung verschiedener Wärmegrade bestimmen sollen, einen nicht unbedeutenden Anteil. Beim Durchlesen der uns zugänglichen Literatur, wie sie in den Arbeiten von Jensen[1]), Haaland[2]), Clowes[3]), Clowes und Baeslack[4]), Michaelis[5]), Flexner und Jobling[6]) u. a. m. enthalten ist, überrascht uns vor allem die merkwürdige Tatsache, dass in keiner von den erwähnten Abhandlungen die Dauer der Lebensfähigkeit der Tumorzellen ausserhalb des Organismus bei 37° C angegeben worden ist. Mit Ausnahme von Jensen haben alle Autoren Temperaturgrade ausgewählt, die viel höher als die Bruttemperatur liegen, z. B. 44° C und 56° C. Jensen konnte zeigen, dass 48stündiges Verweilen im Brutschrank bei 37° C die Zellen abtötet, aber sein 24 Stunden dauernder Versuch ist wegen frühzeitigen Absterbens der vier inoculierten Mäuse fehlgeschlagen.

---

1) Jensen, Zbl. f. Bakt., 1903, Bd. 34, Nr. 28.

2) Haaland, diese Wochenschr., 1906, Bd. 43, Nr. 40; Third scient. rep. of the Imper. Cancer Research Fund, 1908, p. 207.

3) Clowes, Brit. med. journ., 1906, Vol. 2, p. 1548.

4) Clowes and Baeslack, Journ. of exper. med., 1906, Vol. 8, p. 481.

5) Michaelis, Zschr. f. Krebsforsch., 1907, Vol. 5, p. 189.

6) Flexner and Tobling, Proc. of the soc. for exp. biol. and med., 1906—07, Vol. 4, p. 156.

Gelegentlich anderer Versuche im Bereiche der experimentellen Carcinomimmunität kam es uns vor allem darauf an, die Wirkung der Bruttemperatur auf die Transplantations- und Wucherungsfähigkeit der Mäusecarcinomzellen genau zu wissen, insbesondere die Zeit zu bestimmen. die nötig ist, um alle weitere Wucherung vollständig aufzuheben.

Zu diesem Zwecke haben wir den Mauscarcinomstamm 63 gewählt, einen Stamm, der in unserem Laboratorium seit 1907 fortgezüchtet worden ist und sich als der zuverlässigste für alle solche Experimente erwiesen hat. Stamm 63 geht regelmässig in 100 pCt. an, erzeugt makroskopische Lungenmetastasen in einer hohen Prozentzahl, und wie der eine von uns in einer früheren Publikation[1]) ausführlich beschrieben hat, besitzt dieses Carcinom die noch wichtigere Eigenschaft, dass es keine Resistenz oder Immunität in den inoculierten Mäusen hervorruft und infolgedessen kein spontanes Zurückgehen zeigt. Die Wichtigkeit der letztgenannten Eigenschaft kann nicht übertrieben werden, da sie den Stamm als einen Prüfstein für jeden Eingriff charakterisiert, insbesondere wenn man die therapeutische Wirkung neuerer Behandlungsmittel erfahren will. Da alle Tochtertumoren dieses Carcinoms normalerweise progressiv wachsen, so ist es sehr leicht zu sehen, ob das angewandte Mittel einen hemmenden oder unter Umständen einen fördernden Einfluss auf die Tumorentwicklung ausübt. Arbeitet man dagegen mit Tumorstämmen. die fähig sind, eine Autoimmunisation hervorzurufen, so kann man sehr leicht zu irrigen Schlüssen geführt werden.

Die eklatanten günstigen Resultate, die von so manchen Autoren auf dem Felde der Chemotherapie der transplantablen Tumoren angekündigt worden sind, scheinen uns nur auf dem völligen Ignorieren dieser biologischen Eigenschaft der geprüften Tumorstämme zu beruhen. Es sind in unserem Laboratorium eine ganze Reihe chemotherapeutischer Heilmittel[2]), die von verschiedenen Autoren als sehr wirksam bezeichnet worden sind, an solchen einwandsfreien Tumorstämmen geprüft worden, aber im Gegensatz zu den schönen positiven Resultaten dieser namhaften Autoren haben wir immer nur negative erhalten. Unserer Meinung nach scheinen alle diese verfrühten Mitteilungen eher befähigt, die ganze Arbeit auf dem Gebiete der experimentellen Krebsforschung in Misskredit zu bringen, da sie immer falsche Hoffnungen erwecken, anstatt einen Gewinn für die wirklich therapeutische Behandlung des Krebses herbeizuführen.

Wie schwer es ist, einen in jeder Beziehung einwandsfreien Tumorstamm zu erhalten, geht aus der Tatsache hervor, dass von den über 100 zu verschiedenen Zeiten kultivierten Carcinomstämmen in diesem Laboratorium nur zwei (Stamm 63 und Stamm T)

---

1) Russell, Fifth scient. report of the Imper. Cancer Research Fund, 1912.

2) Eleventh annual report of the Imperial Cancer Research Fund, London 1913.

sich als frei von Autoimmunisation erwiesen haben, und von den zahlreichen Sarkomstämmen kein einziger sich als frei von dieser die therapeutischen Versuche belästigenden Eigenschaft bezeichnet werden kann. Wenn Gruppen von solchen nicht immunisierenden Stämmen einmal angewachsen sind, so ergeben sich Verhältnisse, die diejenigen bei der Transplantation von Spontantumoren ins Spontantier selbst, soweit wir jetzt wissen, genau wiederholen. Wie Haaland[1]) bewiesen hat, erzeugt ein Spontantumor im Spontantier selbst niemals Immunität und bleibt von der künstlich erzeugten Immunität vollständig unberührt. Das ähnliche Verhalten unserer Stämme 63 und T ist allerdings sekundär[2]), gestattet aber das unbedingt notwendige Ausschalten der Immunreaktion beim geimpften Tiere.

Um nun zu unserem eigentlichen Thema zurückzukehren, so machten wir die Prüfung des Ueberlebens der Carcinomzellen auf folgende Weise. Unter aseptischen Kautelen werden mit einer feinen Schere die Tumormassen zu einer groben Emulsion geschnitten, die ohne irgendwelchen Zusatz in 25 cm lange Glasröhren (äusserer Durchmesser 5 mm, innerer Durchmesser 3 mm) aufgesogen werden. Die Röhren werden dann in der Flamme unter Vermeidung aller Erhitzung des Tumorgewebes sorgfältig an den Enden zugeschmolzen, in den Brutschrank (37° C) gestellt, und nach bestimmten Intervallen wird ein Rohr herausgenommen, und das enthaltene Gewebe einem Dutzend Mäusen mit einer speziell konstruierten Glasspritze inoculiert. In den verschiedenen Serien wurde, wie immer im hiesigen Laboratorium, besonders darauf geachtet, Mäuse von demselben Alter, derselben Rasse usw. zu wählen. Dieselbe Menge Tumormaterial, nämlich 0,03 ccm, wurde in jedem Falle injiziert. Die gewonnenen Resultate glauben wir, mit Hilfe der drei beigegebenen Abbildungen klar und leicht verständlich darzulegen; in diesen Abbildungen sind die Tumoren als schwarze Silhouetten aufgezeichnet, die alle auf denselben Maassstab ($^{1}/_{5}$) reduziert worden sind.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, bewirkt ein zweistündiger Aufenthalt im Brutschrank keine merkliche Schädigung der Transplantationsfähigkeit der Tumorzellen; der Stamm geht noch in 100 pCt. an, und die einzelnen Tochtertumoren wachsen ebenso schnell, als wenn sie von frischem Tumormaterial herausgewachsen wären.

Ein vierstündiges Verweilen bei 37° C ändert nichts an der Angangsfähigkeit, es tritt jedoch schon eine kleine, aber noch bemerkbare Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Tochtertumoren ein. Dies tritt noch deutlicher hervor beim Experiment mit sechsstündiger Erwärmung des Ausgangsmaterials, wie es an Abbildung 2 zu sehen ist; hier erfolgt

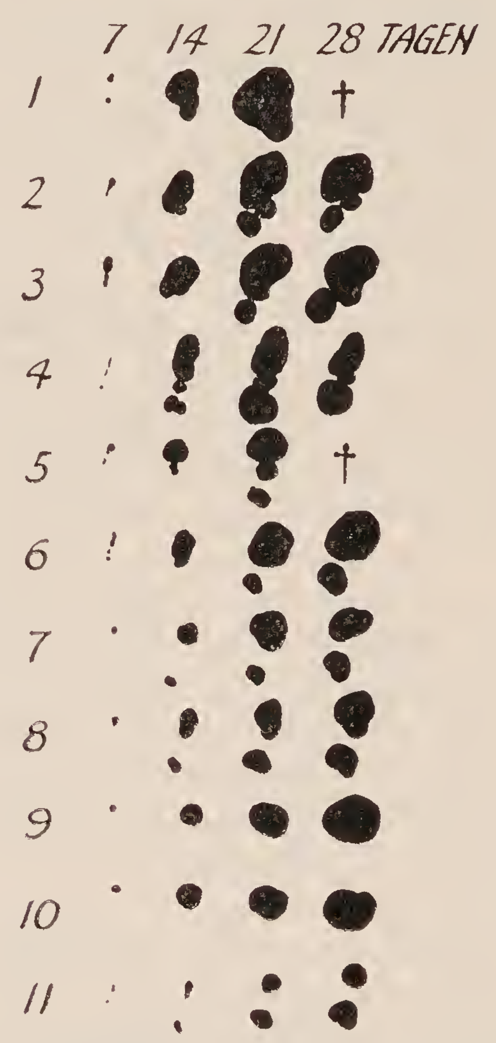
---

1) Haaland, Fourth scient. report of the Imper. Cancer Research Fund, 1911.

2) Russell, Fifth scient. report of the Imper. Cancer Research Fund, 1912.

bei keiner einzigen Maus ein vollständiges Aufhören des Wachstums. Wenn man jedoch die einzelnen Tumoren besonders am 14. Tage betrachtet, zeigt sich in jedem Falle eine deutlich zutage tretende Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit. Abbildung 3 zeigt das mit achtstündigem erwärmten Material gewonnene Resultat. Das Bild hat sich hier stark verändert; mit Ausnahme von drei Mäusen ist die Verimpfung völlig negativ geblieben, und an diesen drei Mäusen haben sich nur sehr kleine, langsam wachsende Knötchen entwickelt. Zwölf andere Mäuse, die mit zwölfstündigem erwärmten Material inoculiert sind, haben ein ganz negatives Resultat ergeben. Nach diesen Experimenten liegt der

Abbildung 1.



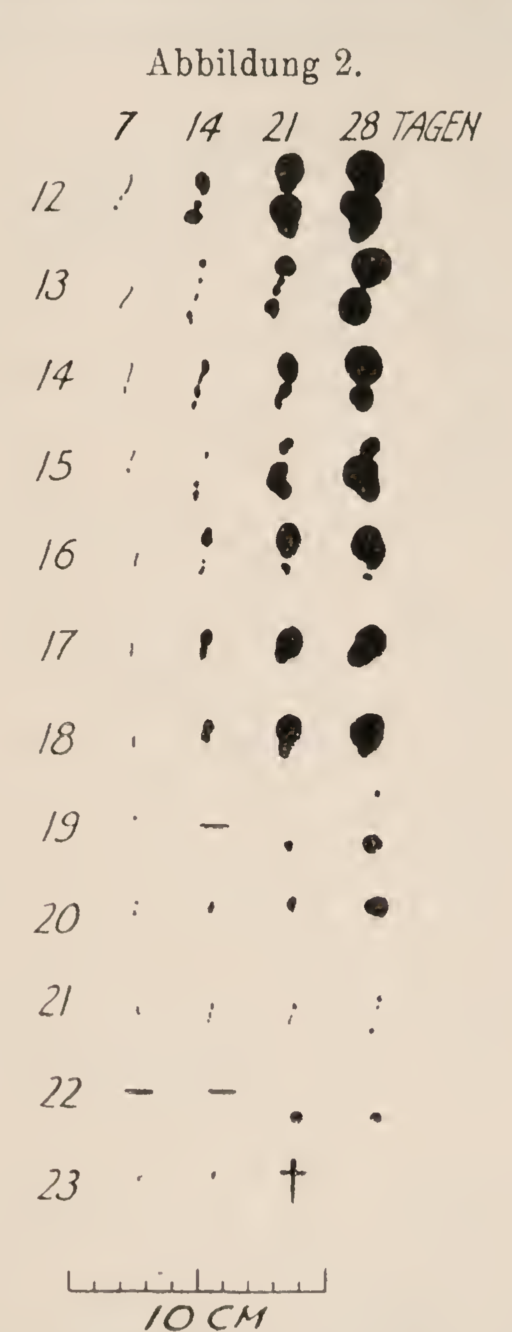
Experiment 63/89 B, ausgeführt am 10. XII. 1913. Mäuse 1—11 inoculiert in die rechte Seite mit 0,03 ccm. Carcinomgewebe, das auf 37° C zwei Stunden ante inoculationem gehalten wurde. Die Abbildung zeigt in den vertikalen Reihen die Grösse der einzelnen Tochtertumoren nach 7, 14, 21 und 28 Tagen.

kritische Punkt zwischen 6 bzw. 4 und 8 Stunden. Spätere erweiternde Untersuchungen haben als Hauptresultat ergeben, dass in der Regel bis zu $7^1/_2$ Stunden noch vereinzelt kleine Knötchen sich in einer niedrigen Prozentzahl entwickeln können.

Zur Erklärung dieser Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit wären vielleicht manche Autoren geneigt, eine Herabsetzung der Virulenz heranzuziehen, jedoch halten wir es nicht für nötig, diese so viel missbrauchte Bezeichnung in An-

wendung zu bringen; die erhobenen Befunde glauben wir einzig und allein durch die immer stärker werdende Verminderung der Zahl der überlebenden Zellen zu erklären, da dasselbe Resultat durch die absichtliche Inoculation von minimalen Quantitäten Tumormaterials erzielt werden kann. Dass alle Zellen nicht zur selben Zeit abgetötet worden sind, bildet ein Analogon zu den mit radioaktiven Substanzen erzielten Ergebnissen, da hier bekanntlich eine stärkere Wirkung auf schnell wachsende Zellen ausgeübt wird und alle Zellen eines Tumors nicht eine gleichmässige Resistenz gegen schädliche Einflüsse besitzen.

Abbildung 2.



Experiment 63/89 B, ausgeführt am 10. XII. 1913. Mäuse 12—23 inoculiert in die rechte Seite mit 0,03 ccm Carcinomgewebe, das auf 37° C 6 Stunden ante inoculationem gehalten wurde.

Zum Schluss der Beschreibung dieser Experimente müssen wir noch einen Punkt berühren, um aller ungerechtertigten Kritik unserer Resultate vorzubeugen. Man könnte nämlich einwenden, dass durch das Erwärmen des Tumorgewebes die Tumorzellen eine Umstimmung erfahren, die ihnen nunmehr das Vermögen zum Autoimmunisieren verleihen, und dass das Resultat

bei achtstündiger Erwärmung nicht das Abtöten aller Carcinomzellen klipp und klar darstellt. Wir haben uns durch eine zweite Inoculation der betreffenden Mäuse überzeugen können, dass dem nicht so ist. In keiner Serie lässt sich irgendeine Spur von Immunität nachweisen, und somit fällt diese Erklärungsweise fort. Dies Ergebnis steht im Einklang mit der schon mehrmals aus dem hiesigen Laboratorium veröffentlichten Ansicht, dass autolysiertes Gewebe irgendwelcher Art nicht imstande ist, eine Carcinomresistenz zu erzeugen.

In einer jüngst erschienenen Mitteilung über die Wirkung radioaktiver Substanzen auf Mäusekrebs behandelt v. Wassermann[1]) die Frage nach dem Ueberleben der Mäusecarcinomzellen ausserhalb des Organismus bei 37° C und ist zu dem Resultat gekommen, dass ein $4^1/_2$stündiges Verweilen der Tumorstückchen in Ringer'scher Lösung die Zellen noch lebensfähig und leicht transplantierbar lässt. Nach den schwer verständlichen Proto-

Abbildung 3.

	7	14	21	28 TAGEN
24	/	—	.	: •
25	:	—	/	:
26	,	.	.	!
27	i	.	—	—
28	i	—	—	—
29	,	—	—	—
30	:	—	—	—
31	,	—	—	—
32	'	—	.	—
33	—	—	—	—
34	—	—	—	—
35	—	—	—	—

Experiment 63/89 B, ausgeführt am 10. XII. 1913. Mäuse 24—35 inoculiert in die rechte Seite mit 0,03 ccm Carcinomgewebe, das auf 37° C 8 Stunden ante inoculationem gehalten wurde.

---

1) v. Wassermann, D.m.W., 1914, Bd. 40, S. 524.

kollen v. Wassermann's zu urteilen, scheinen seine Experimente nicht weit genug begründet, um die Schnelligkeit der autolytischen Vorgänge bis zur vollständigen Aufhebung weiterer Fortpflanzungsfähigkeit genau zu bestimmen. Deshalb haben wir beschlossen, unsere früher gemachten Untersuchungen über diesen Gegenstand jetzt zu veröffentlichen.

Ueber die Wirkung radioaktiver Substanzen auf Mäusekrebs in vitro brauchen wir nicht ins Detail einzugehen, dieselbe hat aber das Interesse des hiesigen Laboratoriums seit 1904 beschäftigt. Im Jahre 1909 hat Haaland in unserem Laboratorium den merkwürdigen Befund erhoben, dass das der Wirkung von Radium für 22 Stunden in der Kälte ausgesetzte Tumormaterial, ohne seine histologische Beschaffenheit im mindesten zu verändern, seine frühere Eigenschaft, eine starke Immunität hervorzurufen, vollständig eingebüsst hat. Erweiternde und bestätigende Beobachtungen über diesen Befund liegen in den Veröffentlichungen von Russ und Wedd[1], [2], [3]) vor. Diese beiden Londoner Forscher haben sehr wichtige und interessante Experimente über die Wirkung radioaktiver Substanzen auf übertragbare Mäuse- und Rattentumoren gemacht, Experimente, die an Gründlichkeit und Exaktheit der Ausführung noch nicht übertroffen worden sind. Bei ihren Untersuchungen mit Radium haben sie die Kombinationen α-, β- und γ-Strahlen, β- und γ-Strahlen und γ-Strahlen angewandt; dabei ergab sich, dass die β-Strahlen am wirksamsten waren. Mit den letztgenannten Strahlen genügt eine Exposition von 60 Minuten, um die spätere Tumorentwicklung zu verhindern; eine 30 Minuten lange Bestrahlung bewirkt eine Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit. Weiter haben W. und R. die interessante Beobachtung gemacht, dass bis zum 6. Tage nach der Inoculation in normalen Mäusen von Greffen, die mehrere Stunden mit β-Strahlen irradiert waren, karyokinetische Figuren noch vorhanden waren. Dieses Ergebnis mit v. Wassermann's theoretischen Betrachtungen in Einklang zu bringen ist schwer, jedoch scheinen diese Arbeiten v. Wassermann völlig entgangen zu sein, da dieselben nirgendwo in seiner Abhandlung Erwähnung finden.

Bei der Zusammenfassung unserer eigenen Befunde würden sich die folgenden Schlüsse als die wichtigsten ergeben. Ein achtstündiges Verweilen der Mäusecarcinomzellen bei 37° C genügt in der Regel, den Tumorzellen ihrer Transplantationsfähigkeit vollständig zu berauben. Ferner besitzen die Zellen desselben Tumors nicht alle denselben Grad von Resistenz gegen die bei dieser Temperatur auftretenden schädlichen Einflüsse. Schon nach einer

---

1) Wedd und Russ, Arch. of Middlesex Hosp., 1912, Vol. 27, p. 50.

2) Russ und Chambers, Arch. of Middlesex Hosp., 1913, Vol. 30, p. 120.

3) ~~Russell, Fifth scientific report of the Imperial Cancer Research Fund, 1912.~~ Wedd & Russ, Jour. of Path. & Bact. 1912, XVII, 1

vierstündigen Erwärmung tritt eine deutliche Verminderung der Zahl der überlebenden Carcinomzellen ein. Mit dem letztgenannten Phänomen verbunden besteht die Möglichkeit, dass beim Untersuchen mehrerer Tumorstämme kleine Unterschiede in der vita propria ergeben werden. Die verschiedene Empfindlichkeit der einzelnen Zellen gegen die Körpertemperatur ausserhalb des Körpers wäre vielleicht mit ihrem Verhalten den radioaktiven Strahlen gegenüber in einer uns noch unbekannten Weise in Zusammenhang zu bringen.

Druck von L. Schumacher in Berlin N. 4.

